

# STEP ONE Plusの使い方 クイックスタート版

PCを起動させる。  
WindowsにLoginする。(Administrator / no password)  
StepOne Software v2.2を起動。

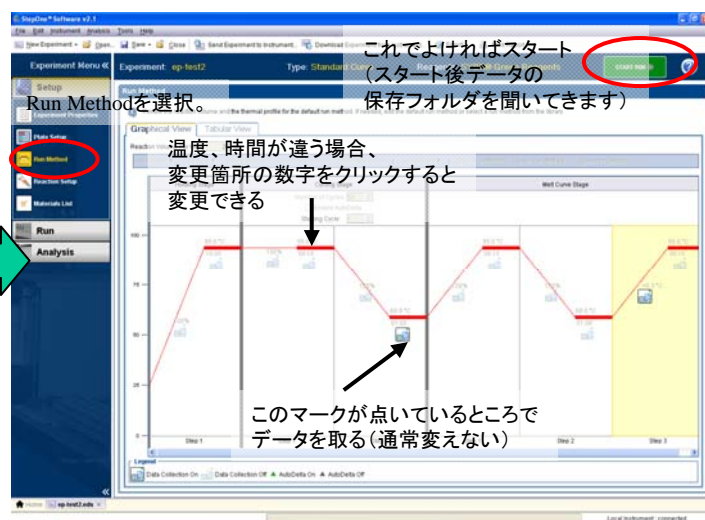
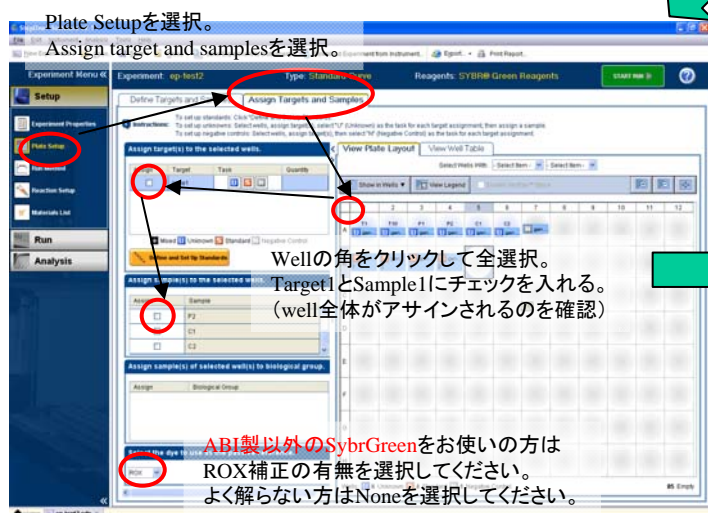
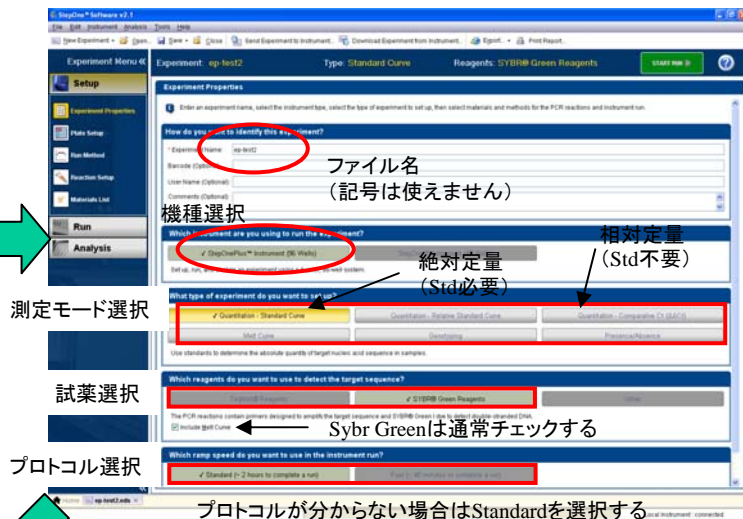
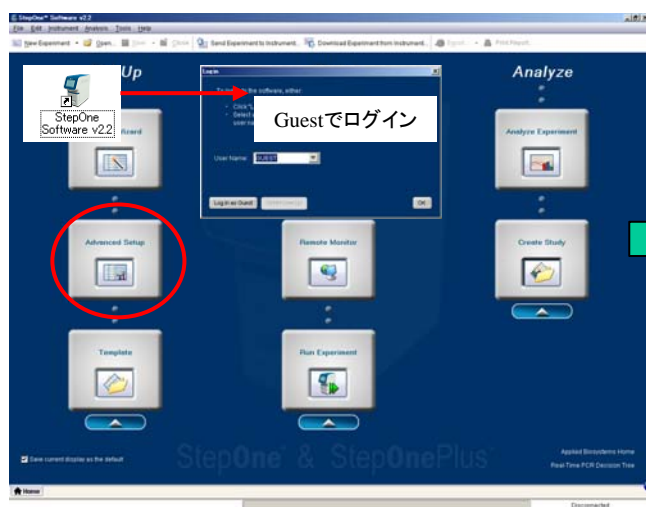
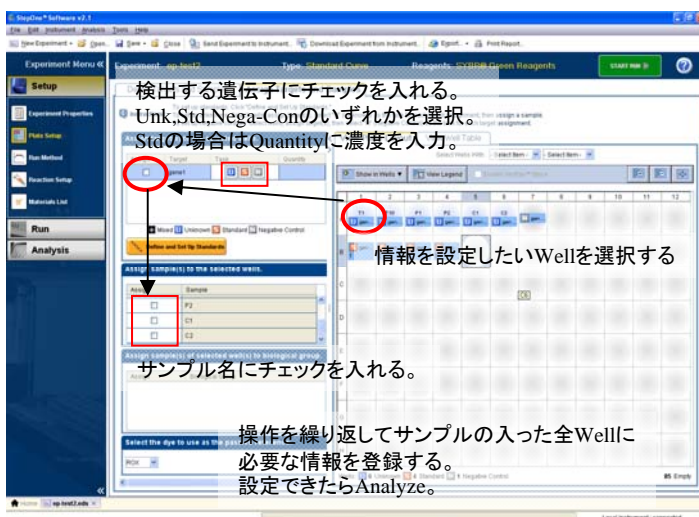
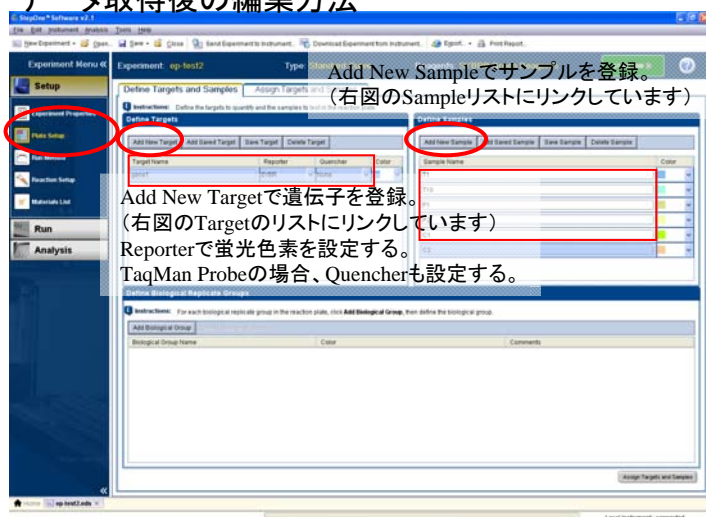


Plate Setupの情報はデータ取得後に編集可能です。  
とりあえず上記設定でスタートしてデータ取得後に  
ゆっくり編集してください。

## データ取得後の編集方法



# STEP ONE Plusの使い方

## TaqManを使ったGenotyping

**StepOne Software v2.2**

Guestでログイン

Experiment Propertiesを開く

何か名前を付ける

使用機器はSTEP ONE PLUS

ジェノタイピングを選択

TaqManを選択

Taqによって変える  
分からない時はStandardにする

Plate setupを開く

測定する遺伝子を登録する

測定するサンプル名を登録する

標識している色素を選ぶ

Wellをクリックし、そこに入っているサンプルと遺伝子を選択する (TaskはUnknown)

同様にNegative Controlを設定する (Sampleは選択しない)

これでよければスタート

Run Methodを開く

温度、時間が違う場合、変更箇所の数字をクリックすると変更できる

このマークが点いているところでデータを取る (通常変えないこと)

自動解析されない場合、集団をドラッグしてApply Callからタイプを選ぶ

Plotに点がない場合はAnalyzeする

Wellとポイントが相互リンクしている

測定後

メモ

データをExcelやPowerPointに持っていく場合はExportする  
グラフ内やPlate Layout内を右クリックし、Save asすると図がJpegで保存できる  
Plate LayoutのA1の左上を右クリックし、Copyし、ExcelでPasteするとView Well Tableを再現できる



# STEP ONE Plusの使い方

## 絶対定量法(検量線法)

検量線作成には絶対量の分かっているサンプルを使用する。  
そのサンプルの希釈系を準備してStandardとする。

### ソフト起動 → Guestでログイン → Advanced setup

Experiment Propertiesを開く

何か名前を付ける

Step one plusを選択

検量線法を選択

TaqManかSYBRを選ぶ

SYBRは必ずMeltCurveを作る

Taqによって変える  
分からない時はStandardにする

Assign Targets and Samplesに切り替え

Wellをクリックし、  
そこに入っているサンプルと  
遺伝子とTaskを選択する  
(StandardはQuantityに量を入力)

純正試薬はROXが入っています  
ROXが入っていない場合はNoneにする  
(ROXが入っていても正しく使っていない時はデータがばらつきます)

Plate setupを開く

ラベルしている色素を選ぶ

遺伝子名を入力

サンプル名を入力

Run Methodを開く

温度、時間が違う場合、  
変更箇所の数字をクリックすると  
変更できる

これでよければスタート

このマークが点いているところで  
データを取る(通常変えないこと)

## 解析は解りません

問題のあるサンプルが  
ここに表示されます  
右図を参考に  
改善してください

フラッグ	説明
AMPNC	ネガティブコントロールで増幅
BADROX	異常なバッチリファレンス信号
BLFAIL	ベースラインアルゴリズムに失敗
CTFAIL	C <sub>t</sub> 値アルゴリズムに失敗
EXPFAIL	指数増幅アルゴリズムに失敗
HIGHSD	反応グループで高標準偏差
MTP	複数の Tm ピーク
NOAMP	増幅なし
NOISE	プレート内の他よりノイズが高い
NOSIGNAL	ウェルに信号なし
OFFSCALE	蛍光がオフスケール
OUTLIERFG	反応グループに域外値
SPIKE	ノイズスパイク
THOLDFAIL	閾値アルゴリズムに失敗

設定の使い回し方法(全てのプロトコルで使用可能)  
次回測定時も同じ条件、レイアウトで行いたい場合、  
以下の方法で設定を使い回せます。

1. 測定後のファイルを開く
  2. File - Save as template でテンプレートファイルを作る
  3. 測定後のファイルを閉じる
  4. 保存したテンプレートファイルを開く
  5. File - Save as で新しいファイルを作る
- これでSTARTが押せるようになります

# STEP ONE Plusの使い方

## 相対定量法(検量線法)

検量線には最大値を出すサンプルを使用する。  
そのサンプルの希釈系を準備してStandardとする。  
作成した検量線からTargetと内在性コントロールの相対値を計算。  
Target / E-Control の比を計算。  
Referenceに指定したサンプルを1とした値に再計算。

ソフト起動 → Guestでログイン → Advanced setup

**Experiment Propertiesを開く**  
何か名前を付ける  
Step one plusを選択  
Relative standard curveを選択  
TaqManかSYBRを選ぶ  
SYBRは必ずMeltCurveを作る  
Taqによって変える  
分からない時はStandardにする

**Plate setupを開く**  
ラベルしている色素を選ぶ  
遺伝子名を入力  
サンプル名を入力

**Assign Targets and Samplesに切り替え**  
Wellをクリックし、そこに入っているサンプルと遺伝子とTaskを選択する (StandardはQuantityに量を入力)  
相対比の基準(1)にしたいサンプルを選択  
補正用の内在性コントロールを選択  
純正試薬はROXが入っています  
ROXが入っていない場合はNoneにする (ROXが入っていても正しく使っていない時はデータがばらつきます)

**Run Methodを開く**  
これでよければスタート  
温度、時間が違う場合、変更箇所の数字をクリックすると変更できる  
このマークが点いているところでデータを取る(通常変えないこと)

## 解析は解りません

問題のあるサンプルがここに表示されます  
右図を参考に改善してください

フラグ	説明
AMPNC	ネガティブコントロールで増幅
BADROX	異常なバッチリファレンス信号
BILFAIL	ベースラインアルゴリズムに失敗
CTFAIL	C <sub>t</sub> 値アルゴリズムに失敗
EXPFAIL	指数増幅アルゴリズムに失敗
HIGHSD	反復グループで高精度偏差
MTP	複数の Tm ピーク 参考: このフラグは、実験に融解曲線が含まれる場合にのみ表示されます。
NOAMP	増幅なし
NOISE	プレート内の他よりノイズが高い
NOSIGNAL	ウェルに信号なし
OFFSCALE	蛍光がオフスケール
OUTLIERFG	反復グループに域外値
SPIKE	ノイズスパイク
THOLDFAIL	閾値アルゴリズムに失敗

設定の使い回し方法(全てのプロトコルで使用可能)  
次回測定時も同じ条件、レイアウトで行いたい場合、  
以下の方法で設定を使い回せます。

1. 測定後のファイルを開く
2. File - Save as template でテンプレートファイルを作る
3. 測定後のファイルを閉じる
4. 保存したテンプレートファイルを開く
5. File - Save as で新しいファイルを作る  
これでSTARTが押せるようになります



# STEP ONE Plusの使い方

相対定量法(検量線を作成しない $\Delta\Delta$ CT法)

$\Delta\Delta$ CTが使える条件

- ・ターゲットと内在性コントロールのPCR効率がほぼ同じ
- ・PCR効率が100%に近いこと

ソフト起動 → Guestでログイン → Advanced setup

Experiment Propertiesを開く

何か名前を付ける

Step one plusを選択

$\Delta\Delta$ CTを選択

TaqManかSYBRを選ぶ

SYBRは必ずMeltCurveを作る

Taqによって変える  
分からない時はStandardにする

Plate setupを開く

ラベルしている色素を選ぶ

遺伝子名を入力

サンプル名を入力

Assign Targets and Samplesに切り替え

Wellをクリックし、そこに入っているサンプルと遺伝子とTaskを選択する

Run Methodを開く

これでよければスタート

温度、時間が違う場合、変更箇所の数字をクリックすると変更できる

このマークが点いているところでデータを取る(通常変えないこと)

相対比の基準(1)にしたいサンプルを選択

補正用の内在性コントロールを選択

純正試薬はROXが入っています  
ROXが入っていない場合はNoneにする  
(ROXが入っていても正しく使っていない時はデータがばらつきます)

## 解析は解りません

問題のあるサンプルがここに表示されます  
右図を参考に改善してください

フラグ	説明
AMPNC	ネガティブコントロールで増幅
BADROX	異常なバッチリファレンス信号
BLFAIL	ベースラインアルゴリズムに失敗
CTFAIL	C <sub>t</sub> 値アルゴリズムに失敗
EXPFAIL	指数増幅アルゴリズムに失敗
HIGHSD	反復グループで高精度偏差
MTP	複数の Tm ピーク 参考: このフラグは、実験に融解曲線が含まれる場合にのみ表示されます。
NOAMP	増幅なし
NOISE	プレート内の他よりノイズが高い
NOSIGNAL	ウェルに信号なし
OFFSCALE	蛍光がオフスケール
OUTLIERFG	反復グループに域外値
SPIKE	ノイズスパイク
THOLDFAIL	閾値アルゴリズムに失敗

設定の使い回し方法(全てのプロトコルで使用可能)  
次回測定時も同じ条件、レイアウトで行いたい場合、  
以下の方法で設定を使い回せます。

1. 測定後のファイルを開く
  2. File - Save as template でテンプレートファイルを作る
  3. 測定後のファイルを閉じる
  4. 保存したテンプレートファイルを開く
  5. File - Save as で新しいファイルを作る
- これでSTARTが押せるようになります